

Sonderdruck aus:
„ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG“
(Arzneim.-Forsch. 5, 475—478 [1955])
Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

*Aus der Pharmakologischen und Bakteriologischen
Abteilung der Asta-Werke AG.,
Chemische Fabrik, Brackwede/Westf.*

**Der Einfluß gelöster Substanzen auf
die Entfernung wasserlöslicher Pyrogene
durch Filtration (Seitfilter)**

Von
Professor Dr. Norbert Brock, Dr. Franz J. Geks
und Dr. Dietrich Lorenz

B 70224

*Aus der Pharmakologischen und Bakteriologischen
Abteilung der Asta-Werke AG., Chemische Fabrik,
Brackwede/Westf.*

Der Einfluß gelöster Substanzen auf die Entfernung wasserlöslicher Pyrogene durch Filtration (Seitzfilter)

Von Professor Dr. Norbert Brock,
Dr. Franz J. Geks und Dr. Dietrich Lorenz

Von den verschiedenen bakteriendichten Filtern, die für die Herstellung bakterienfreier Injektionslösungen Verwendung finden, haben die Seitz-EK- und EKS-Filter noch zusätzlich die Eigenschaft, unter bestimmten Bedingungen Pyrogene aus einer Lösung zurückzuhalten [1, 2].

Wilke u. Voss, die in dieser Zeitschrift hierüber kurzlich berichtet haben, machen allerdings die Einschränkung, daß hierbei der Gehalt an Pyrogenen in der Filtrationslösung ein bestimmtes Ausmaß nicht überschreiten dürfe. Darüber hinaus würden die von ihnen ermittelten Werte nur für „reines Wasser“ bzw. wäßrige Lösungen mit echt gelösten Komponenten gelten, auf Lösungen mit hohen Anteilen an großmolekularen bzw. kolloidalen Substanzen seien ihre Ergebnisse nicht übertragbar.

Damit werden von den genannten Autoren einige Schwierigkeiten angedeutet, mit denen man in der Praxis doch gelegentlich rechnen muß. Eine eigene Beobachtung gab uns Veranlassung, uns mit diesem Problem eingehender zu befassen und die methodischen Voraussetzungen der Herstellung pyrogenfreier Lösungen weiter zu klären.

Bei der Überprüfung einer Versuchscharge eines Injektionspräparates (5%ige Lösung des Dinatriumsalzes des Diaethyldioxystilben-diphosphats), die einige Wochen bei Zimmertemperatur gestanden hatte, stellten wir fest, daß die Lösung stark pyrogenhaltig war. Bei der Austestung am Kaninchen entsprach die Fieberwirksamkeit pro ml Lösung etwa der Wirkung von 10 γ eines von uns hergestellten „wasserlöslichen Pyrogens“ (W. P.) bzw. von 300 E Pyrifer*). Dieser Pyrogengehalt ließ sich trotz zehnfacher Filtration durch jeweils frische Seitz-EKS-Filter nicht eindeutig vermindern. Vergleichsweise setzten wir diese Pyrogenmenge — in Form von W. P. — einer pyrogenfreien, 5%igen Lösung des Dinatriumsalzes des Diaethyldioxystilben-diphosphats zu. Auch in diesem Fall ließ sich durch anschließende, mehrfache Filtration keine Verminderung des Pyrogengehaltes erzielen (Tab. 1).

*) Pyrifer, E. Wz., Asta-Werke AG., Brackwede/Westf. Das Präparat enthält fiebererregende Eiweißstoffe aus apathogenen Bakterienstämmen der *Coli*-Gruppe.

Tab. 1: Verminderung der pyrogenen Aktivität verschiedener echter Lösungen mit definiertem Pyrogengehalt durch Filtration (Seitz-EKS-Filter). — Eine pyrogene Einheit ist die Pyrogenmenge, welche im Kaninchentest eine durchschnittliche Temperatursteigerung um 1° C bewirkt. Der relative osmotische Druck einer 0,9%igen Kochsalzlösung wurde gleich 1 gesetzt.

	Konzentration der Lösung	relativer osmotischer Druck	Pyrogenezusatz in γ/ml	Pyrogene in 1 ml vor der Filtration	Einheiten Lösung nach der Filtration	Pyrogene Restaktivität nach der Filtration
Kochsalz	0,9%ig	1	0,4	1,1	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
			50	330	0,25	$\frac{1}{1320}$
	5%ig	3,3	0,4	1,8	0,04	$\frac{1}{44}$
			50	417	19	$\frac{1}{22}$
Traubenzucker	5%ig	0,48	0,4	2	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
			50	417	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
	10%ig	1,6	0,4	3,3	0,067	$\frac{1}{49}$
			50	336	250	$\frac{1}{1,4}$
Dinatriumsalz des Stilboestrol- diphosphats Mol.-Gew. 472	5%ig	1	10	66	66	$\frac{1}{1}$

Wilke u. Voss war es gelungen, Lösungen mit einem Pyrogengehalt entsprechend 50 E Pyrifer/ml durch Seitz EKS pyrogenfrei zu filtrieren; selbst bei Anwesenheit von 500 E/ml erzielten die Autoren durch einmalige Filtration wenn auch keine Pyrogenfreiheit, so doch eine gewisse Verminderung des Pyrogengehaltes. Allerdings handelt es sich hier um Untersuchungen mit dem Präparat Pyrifer, bei dem nur 10% der pyrogenen Gesamtaktivität als WP vorliegt. In Lösungen, die demgegenüber eine wesentlich geringere pyrogene Gesamtaktivität (20 E/ml), diese jedoch ausschließlich in Form von WP enthielten, konnten auch Wilke u. Voss eine vollständige Pyrogenfreiheit durch Filtration nicht erzielen; immerhin war ein deutlicher Filtrationseffekt nachweisbar. In der Deutung unserer eigenen Versuche war somit daran zu denken, daß der fehlende Filtrationseffekt durch Unterschiede der Pyrogenkonzentration zu erklären sei (500 E/ml WP in unserem Versuch gegenüber 20 E/ml WP bei Wilke u. Voss). Dennoch war es auffallend, daß angesichts unserer umfangreichen Filtrationsmaßnahmen (10malige Filtration und ständiger Filterwechsel) eine Pyrogen-Verminderung nicht festzustellen war. Da Wilke u. Voss in ihren Versuchen physiologische Kochsalzlösung verwendet hatten, stellten wir uns die Frage, ob außer der Art und der Konzentration des Pyrogens auch die Art und Größe der gleichzeitig in Lösung befindlichen Elektrolyte bzw. Moleküle sowie ihre Konzentration einen Einfluß auf die Pyrogen-Adsorption der Filterschichten haben könnte.

1. Einzelheiten zur Methodik

a) Testlösungen und Filtration

Als Modellsubstanzen wählten wir Kochsalz und Traubenzucker, ersteres als Typ eines Elektrolyten letzteres als Typ eines Nichtelektrolyten mittlerer Molekülgröße. Die Konzentration der Kochsalzlösung war 0,9%ig bzw. 5%ig, die der Traubenzuckerlösung 5%ig bzw. 10%ig.

Den sterilen, pyrogenfreien Lösungen setzten wir W.P. in verschiedener Konzentration zu, und zwar in der ersten Versuchsreihe jeweils 0,4 γ Pyrogen/ml (entsprechend 12 E Pyrifer/ml) und in der zweiten 50 γ Pyrogen/ml (entsprechend 1500 E Pyrifer/ml). Dieser Pyrogenzusatz umfaßt in seinem Bereich wohl alle praktisch vorkommenden Pyrogenverunreinigungen.

Von dem einzelnen Ansatz (ca. 200 ml) schickten wir etwa 180 ml durch ein ungebrauchtes, kleines EKS-Filter (Seitz EKS, Größe 6 nach Uhlenhuth) und bewahrten das Filtrat und die restlichen, unfiltrierten

20 ml über Nacht im Eisschrank steril auf. Am folgenden Morgen testeten wir dann den Pyrogengehalt des gefilterten und ungefilterten Anteils.

Das von uns verwendete Seitz EKS-Filter besaß eine Filterfläche von 20 cm². Die Filterbelastung betrug in allen Versuchen etwa 9 l/1000 cm² Filterfläche, die Pyrogenbelastung mithin bei der geringeren Pyrogenkonzentration 3,6 mg/1000 cm² Filterfläche und bei der höheren Pyrogenkonzentration 450 mg/1000 cm² Filterfläche.

b) Technik der Pyrogentestung

Die Bestimmung des Pyrogengehaltes erfolgte im Kaninchentest.

Hierzu verwenden wir 3–4 kg schwere, 2 Jahre alte Chinchilla-Kaninchen beiderlei Geschlechtes. Die Tiere werden ständig in einem Temperatur-konstanten Raum von 27°C gehalten und höchstens einmal wöchentlich zum Pyrogentest herangezogen. Das Futter besteht aus Hafer, gehäckselttem Heu, frischem Grün und Trinkwasser ad libitum.

Am Vorabend des Versuchstages wird den Tieren Futter und Trinkwasser entzogen und am folgenden Morgen die „normale Körpertemperatur“ der Versuchstiere durch zweimalige rektale Messung im Abstand von 45 min bestimmt. Der zweite Meßwert gilt als Ausgangswert. Die Bestimmung der Körpertemperatur erfolgt mit dem Elektro-Thermometer „Thermorapid“ der Fa. Netheler & Hinz, Hamburg-Eppendorf, unter Verwendung von Thermoelement-fühlern, die mit ihren 3,8 mm dicken Enden 6 cm weit ins Rektum eingeführt werden. Unmittelbar nach der zweiten Messung spritzen wir die Prüflösung steril iv. (Ohrevene) ein, wobei wir das Injektionsvolumen — unabhängig von der jeweils injizierten Dosis — bei jeder vergleichenden Prüfung konstant halten. Es beträgt gewöhnlich 0,5 ml/kg, wird jedoch im Bedarfsfall — besonders bei Anwendung von Lösungen mit niedrigerem Pyrogengehalt — bis auf 5 ml/kg gesteigert. Die Injektionsgeschwindigkeit ist bei Injektionen von 0,5 ml/kg etwa 30 sec, bei Injektion von 5 ml/kg etwa 4 min. Die erforderlichen Verdünnungen werden jeweils mit steriler, pyrogenfreier, physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen.

Im Anschluß an die Injektion wird fünfmal die Körpertemperatur gemessen, und zwar jeweils 60, 120, 210, 330 u. 450 min nach der Injektion. Für die Auswertung wird die sogenannte maximale Temperaturdifferenz, das ist die Differenz zwischen der Ausgangstemperatur und dem höchsten gemessenen Wert, verwendet.

c) Auswertung

Die quantitative Auswertung und der Vergleich der pyrogenen Wirksamkeit in der unfiltrierten und filtrierten Lösung erfolgte mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven.

Zur Ermittlung derartiger Dosis-Wirkungskurven verabfolgen wir im allgemeinen abgestufte Dosen eines pyrogenen Präparates an Stichproben 7–8 Tieren (je Dosis), berechnen aus den maximalen Temperaturdifferenzen innerhalb der Stichproben die arithmetischen Mittelwerte und tragen diese sowie die zugehörigen Dosen in üblicher Weise in ein halblogarithmisches Koordinatensystem ein.

Bei Einhaltung der oben erläuterten Standardbedingungen und bei Verwendung genügender Tierzahlen ist in einem Bereich der Temperatursteigerung von 0–1,3°C eine gute Annäherung an eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der verabfolgten Dosis und der maximalen Temperaturdifferenz zu erkennen (Abb. 1). Erst oberhalb einer Temperaturdifferenz von 1,3°C streuen unsere Werte stärker, doch reicht der Bereich zwischen 0 und 1,3°C vollkommen aus, um einen exakten Dosis-Wirkungsvergleich durchführen zu können. Die Regression derartiger Wirkungsgeraden ist gut zu reproduzieren, und zwar sowohl bei Verwendung wasserlöslicher Pyrogene als auch bei unserem Präparat Pyrifor. Unter Verwendung eines Standards ist damit eine quantitative Auswertung

mit Hilfe dieser Wirkungsgeraden ohne weiteres auch routinemäßig möglich.

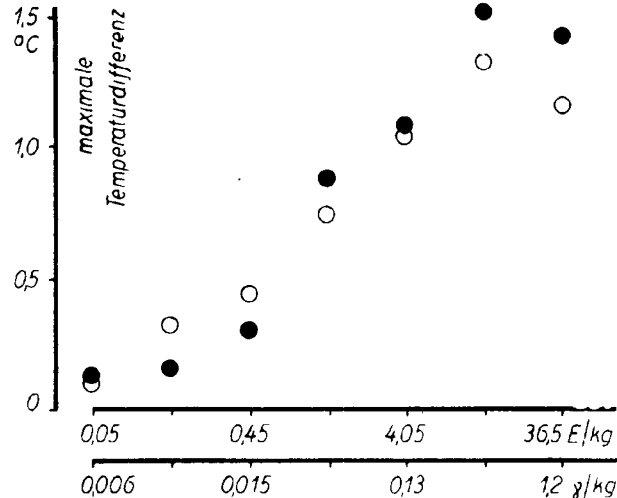


Abb. 1: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen abgestuften Dosen von Pyrifer bzw. einem wasserlöslichen Pyrogen und den durchschnittlichen maximalen Temperaturdifferenzen im Fiebertest am Kaninchen. Ordinate: Durchschnittliche maximale Temperaturdifferenzen (vgl. Text). Abszisse: Dosen von Pyrifer bzw. dem wasserlöslichen Pyrogen (log.). Pyrifer: Dosen in Pyrifer-Einheiten/kg iv. Wasserlösliches Pyrogen: Dosen in γ /kg iv.

In analoger Weise führten wir im vorliegenden Falle die vergleichende Testung der Lösung vor und nach Filtration durch. Als Kriterium der pyrogenen Wirksamkeit bestimmten wir die Pyrogenmenge, welche im Mittel eine maximale Temperatursteigerung von 1° bewirkt. Diese Menge wird im folgenden als „Pyrogen-Einheit“ (PE) bezeichnet. Bei dem von uns verwendeten wasserlöslichen Pyrogenpräparat entsprach 1 PE einer Dosis von 0,1–0,2 γ Reipyrogen/kg iv. (vergl. Abb. 1).

Bei der Testung der unfiltrierten Lösungen begnügten wir uns gewöhnlich mit der Prüfung von 2 Dosen, die auf Grund der Kenntnis der Wirkungsstärke der Präparate so gewählt werden konnten, daß die höhere Dosis einen submaximalen ($<1.5^\circ$, $>0.8^\circ$) und die geringere Dosis einen überschwelligen ($>0.1^\circ$, $<0.5^\circ$) Effekt bewirkten. Die PE ließ sich dann in einfacher Weise aus den beiden Wirkwerten graphisch ermitteln.

Bei den filtrierten Lösungen mußten infolge des zumeist eingetretenen Wirkungsabfalls gewöhnlich

mehrere Dosen injiziert werden, um den geeigneten Auswertungsbereich zu ermitteln. In einigen Fällen war jedoch nach Filtration die Bestimmung einer Wirkungsgeraden überhaupt nicht möglich, wenn auf Grund der starken Wirkungsabnahme die erforderlichen maximalen Injektionsvolumina (5 ml/kg) keine Temperatursteigerung zur Folge hatten. Das galt vor allem bei Prüfung der Lösungen mit der geringen Pyrogeneinwaage von 0,4 γ /ml.

Für den quantitativen Vergleich zwischen dem Pyrogengehalt der unfiltrierten und der filtrierten Lösungen errechneten wir die Anzahl der PE, die jeweils in 1 ml der geprüften Lösungen vor und nach der Filtration nachweisbar waren. Die nach der Filtration noch vorhandene pyrogene „Restaktivität“ berechneten wir als Bruchteil der Ausgangsaktivität vor der Filtration. Der so erhaltene Quotient stellt dann ein anschauliches quantitatives Maß für die Stärke des Filtrationseffektes dar.

2. Versuchsergebnisse

Aus der Aufstellung unserer Versuchsergebnisse (Tab. 1) läßt sich zunächst eine Abhängigkeit der Pyrogenadsorption von der Konzentration der Versuchslösung erkennen. Aus der 0,9%igen Kochsalzlösung ist eine weitgehende Entfernung der Pyrogene durch die Filtration eingetreten. Selbst bei Zusatz der großen Pyrogenmenge von 50 γ /ml ließ sich die Lösung praktisch pyrogenfrei filtrieren; die pyrogene Restaktivität sank auf $\frac{1}{1520}$ der Ausgangsaktivität ab.

Ein analoges Ergebnis erhielten wir auch bei Testung der 3%igen Traubenzuckerlösung; auch bei Zusatz hoher Pyrogendosen war hier eine pyrogene Restaktivität nicht mehr nachweisbar.

Dem gegenüber blieben die stärker konzentrierte Kochsalz- bzw. Traubenzuckerlösung nach der Filtration noch mehr oder weniger deutlich pyrogen wirksam: In der 3%igen Kochsalzlösung sank die Pyrogenaktivität im Falle des geringen Pyrogengehaltes von 0,4 γ /ml nach der Filtration auf $\frac{1}{44}$, bei dem hohen Pyrogengehalt von 50 γ /ml auf $\frac{1}{22}$ der Ausgangsaktivität ab.

Analoge Verhältnisse fanden sich bei Prüfung der 10%igen Traubenzuckerlösung: Bei geringem Pyrogenzusatz (0,4 γ /ml) blieb nach der Filtration eine Restaktivität von $\frac{1}{49}$ nachweisbar, die in der gleichen Größenordnung liegt wie bei der 3%igen NaCl-Lösung;

beim hohen Pyrogenzusatz war allerdings der Adsorptionseffekt wesentlich geringer als in der 3%igen NaCl-Lösung; die Ausgangsaktivität blieb nahezu erhalten (Restaktivität $\frac{1}{1,4}$).

Diskussion:

Unsere Ergebnisse mit den Lösungen geringerer Konzentration stimmen mit den Befunden von Wilke u. Voss gut überein. Die Pyrogenadsorption der EKS-Filter wird durch die in Lösung befindlichen Moleküle bzw. Ionen nicht nachweisbar beeinflusst. Selbst bei Gegenwart hoher Pyrogenkonzentrationen gelingt hier eine weitgehende Entfernung der Pyrogene. Bei der routinemäßigen Aufbereitung derartiger Injektionslösungen kann daher u. E. nach der Filtration sogar im allgemeinen auf eine tierexperimentelle Pyrogenprüfung verzichtet werden.

Im Gegensatz hierzu ist bei Lösungen höherer Konzentrationen ein erhebliches Nachlassen der Pyrogenadsorption zu verzeichnen. Dies ist nicht nur bei Lösungen mit hohen Anteilen an großmolekularen bzw. kolloidalen Substanzen der Fall [2], sondern — wie unsere Untersuchungen zeigen — auch bei echten Lösungen von Elektrolyten bzw. von Substanzen kleinerer und mittlerer Molekülgröße. Diese Beobachtung gewinnt besonders dann praktische Bedeutung, wenn gleichzeitig der Pyrogengehalt groß ist. So betrug die Restaktivität in der 3%igen NaCl-Lösung nach der Filtration bei einem Pyrogenzusatz von 417 PE/ml noch 19 PE/ml, in der 10%igen Traubenzuckerlösung bei einem Pyrogenzusatz von 356 PE noch 250 PE. Bei der pyrogenhaltigen 5%igen Lösung von Stilboestrol-diphosphat (66 PE/ml) war nach der Filtration ein Abfall der Aktivität sogar überhaupt nicht nachweisbar.

Bei einem Vergleich dieser Daten fällt auf, daß die 3%ige NaCl-Lösung weit weniger adsorptionshemmend wirkt als die 10%ige Lösung des größermolekularen Traubenzuckers oder die 5%ige Lösung von Stilboestrol-diphosphat, die nur annähernd die Hälfte bzw. ein Drittel der osmotischen Aktivität der 3%igen NaCl-Lösung besitzen. Offensichtlich wird die Pyrogenadsorption nicht nur durch die Konzentration der Lösung, also durch die Zahl der Moleküle bzw. Ionen pro Volumeneinheit beeinflusst, sondern außerdem auch durch die Molekülgröße bzw. Molekülart. Hinsichtlich des Wirkungsmechanismus der Adsorptionshemmung ist in erster Linie daran zu denken, daß die in Lösung befindlichen Moleküle miteinander um die für die Filtration entscheidende Oberfläche konkurrieren. Nähere Untersuchungen hierüber haben wir indes nicht vorgenommen.

Eine Verunreinigung mit großen Pyrogenmengen läßt sich bei einer lege artis aufbereiteten Injektionslösung in der Regel vermeiden; sie kann jedoch, wie auch unser Beispiel (Stilböstrol-diphosphat) zeigt, gelegentlich vorkommen. Damit kommt der in unseren Versuchen nachgewiesenen pyrogenen Restaktivität praktische Bedeutung zu. Dies wird offensichtlich, wenn man in Pyrifer-Einheiten umrechnet: 19 PE/ml (bei der 3%igen NaCl-Lösung) entsprechen 57 Einheiten Pyrifer/ml; 250 PE/ml (bei der 10%igen Traubenzuckerlösung) sind wirkungsgleich mit 900 E/ml Pyrifer. Diese Restaktivitäten liegen demnach teilweise wesentlich über den Dosen, die in der Klinik im Rahmen der Fiebertherapie Verwendung finden.

Unsere Versuche zeigen, daß die Filtration von Injektionslösungen durch Seitz-Filter nur unter ganz bestimmten Bedingungen eine sichere Entfernung löslicher Pyrogene zur Folge hat. Diese Voraussetzungen sind in der Praxis nicht immer gegeben. Die Verlässlichkeit der Seitz-Filtration muß nach unserer Ansicht praktisch für jede Lösung gesondert nachgewiesen werden.

Zusammenfassung:

Die Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, unter welchen Voraussetzungen Seitz-EKS-Filter zur Entfernung wasserlöslicher Pyrogene aus Injektionslösungen geeignet sind. Um die Grenzen der Methodik näher zu charakterisieren, wurde der Einfluß der Begleitmoleküle auf die Adsorptionskraft der Filter quantitativ verfolgt. Hierbei erhielten wir folgende Ergebnisse:

1. Der Adsorptionseffekt hängt in seinem Ausmaß entscheidend von der Konzentration der Grundlösung ab. Aus Lösungen niedriger Konzentration (0,9%ige NaCl- oder 3%ige Traubenzuckerlösung) ist eine vollständige Entfernung der Pyrogene möglich, in Lösungen höherer Konzentration (3% NaCl, 10% Traubenzucker) bleibt dagegen ein mehr oder weniger großer Teil der Pyrogene im Filtrat zurück.
2. Nicht nur die Zahl, sondern auch die Größe der Moleküle bzw. Ionen beeinflusst die Stärke des Adsorptionseffektes. So wirkt die 10%ige Lösung des relativ groß-molekularen Traubenzuckers wesentlich stärker adsorptionshemmend als die 3%ige NaCl-Lösung, obwohl letztere osmotisch doppelt so aktiv ist.
3. Die Beeinflussung des Adsorptionseffektes kann praktisch bedeutsam werden, wenn gleichzeitig der Pyrogengehalt groß ist.

Summary:

The Influence of Dissolved Substances on the Elimination of Water-soluble Pyrogens by Filtration (Seitz filters).

The question whether Seitz EKS-filters are suitable for the elimination of water-soluble pyrogens from solutions designed for injection has been investigated. In order to demonstrate the limitations of the method, the effect of the addition of other molecules on the adsorption capacity of the filters was investigated. The following results were obtained:

1. The extent of adsorption depends on the concentration of the original solution.

The pyrogens are completely eliminated from solutions of low concentration (0.9% NaCl or 3% saccharose). In solutions of higher concentration (3% NaCl or 10% saccharose) part of the pyrogens will remain in the filtrate.

2. The extent of adsorption is influenced not only by the number, but also by the size of the molecules or ions. The 10% solution of saccharose with its large molecules inhibits the absorption considerably more than 3% NaCl solution, although the osmotic activity of the latter is twice as high.

3. The influence of dissolved substances on the extent of adsorption may bear practical consequences in solutions with a high content of pyrogens.

Literatur:

- [1] Co Tui, McGloskey, K. L., Schrift u. Yates, A. L. (zit. n. [2]), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 35, 297 (1936)
- [2] Wilke, H. u. Voss, H. E., Arzneim.-Forsch. 4, 8 (1954).

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger; Verlag Editio Cantor, Aulendorf i. Württ., Telefon 56; Druck: Vereinigte Buchdruckereien A. Sandmaier & Sohn, Buchau a. F.

Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Quartal (3 Hefte) 9.— DM zuzügl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 4.— DM zuzügl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung. Auslandsabonnements errechnen sich pro Jahr einschließlich Versand auf der Basis von 10 \$.